Anatomische Untersuchungen
des menschlichen Amnions nach Farbstoff-Diffusion

Von
Friedrich Speckmann

Gedruckt in der Buchdruckerei des Tübinger Studentenwerks

Aus der Universitäts-Frauenklinik zu Kiel.
Direktor: Professor Dr. Schröder

Anatomische Untersuchungen des menschlichen Amnions nach Farbstoff-Diffusion

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Christian Albrecht-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Friedrich Speckmann
aus Husum

1931

Gedruckt von der Buchdruckerei des Tübinger Studentenwerks

Rektoratsjahr 1930/31

Referent: Prof. Dr. Runge

Korreferent: Prof. Dr. Schröder

Zum Druck genehmigt: Prof. Dr. Schröder, z. Zt. Dekan

Meinen lieben Eltern!

Die Frage nach der Herkunft des Fruchtwassers und nach dem Austausch von Wasser und Salzen zwischen Fruchtwasser und kindlichem Blut ist aufs engste mit den anatomischen und biologischen Eigenschaften des Amnions verknüpft [1]). Denn diese Eihaut bildet ja die unmittelbare Begrenzung des Fruchtwasserraumes. Aus diesem Grunde sind die Eigenschaften des menschlichen Amnions als Membran in letzter Zeit in einer Anzahl von Arbeiten untersucht worden.

Zu diesen Untersuchungen ist das Amnion um so eher geeignet, als es sich von der geborenen Placenta unschwer abziehen läßt, so daß man nach der Isolierung sowohl die dem Fruchtwasser zugekehrte, aus kubischem Epithel bestehende, als auch die dem Chorion anliegende, aus embryonalem gallertigen Bindegewebe sich zusammensetzende Fläche mit bestimmten Lösungen in Berührung zu bringen imstande ist.

Runge und Schmidt konnten zeigen, daß dem Amnion eine gerichtete Permeabilität zukommt [2]). Die Diffusion von Farbstoffen zeigt eine deutlich nachweisbare und gut reproduzierbare Verschiedenheit, je nachdem man diese Farbstoffe von der inneren epithelialen Seite nach außen oder von der äußeren chorialen Seite nach innen diffundieren läßt, wobei der „Ablauf bei verschiedenen Temperaturen, mit und ohne Sauerstoffzusatz, mit und ohne Giftzusatz sich in überwiegend gleicher Weise entwickelt".

Hermstein stellte in einer Methodik, die der von Runge und Schmidt ähnelt, fest, daß die Wasserdurchlässigkeit des Amnions größer als die des Chorions ist, und daß Keimdichtigkeit nur so lange besteht, wie Chorion und Amnion im Zusammenhang intakt sind [3]).

Vorliegender Arbeit liegt folgende Methodik zugrunde: Um Austauschflächen von derselben Größe zu erhalten, wurde über einen an seinem oberen Ende halbkugeligen, unten fest auf einen Sockel montierten Zylinder ein zweiter an beiden Seiten offener und an seinem oberen Rand nach außen umgefalzter Zylinder gestülpt. Über den Halbkugelabschnitt des geschlossenen Zylinders wurde die Membran unter größtmöglichster Schonung gestülpt und

1) H. Runge: Zentralblatt für Gyn. 1927, S. 46 und 49. — H. Runge, M. Baur, H. Hartmann: Arch. f. Gyn 134, 626, 1928.
2) H. Runge und H. Schmidt: Biochem. Zeitschrift, Band 203, S. 394.
3) Hermstein: Zeitschrift für Geburtshilfe und Gynäkologie, Band 97, S. 199.

auf den offenen Zylinder gebunden. Das so entstandene Amnionsäckchen wurde in ein Becherglas gehängt und mit 10 ccm der betreffenden Lösung beschickt, während in das Becherglas 20 ccm der jeweiligen Außenflüssigkeit eingebracht wurden, wobei genau darauf zu achten war, daß beide Flüssigkeitsspiegel in gleicher Höhe stehen.

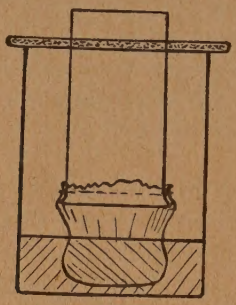

Abbildung 1.

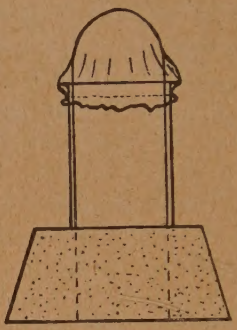

Abbildung 2.

Es wurden jedesmal 6 Versuche angesetzt, und zwar derart, daß bei dreien die choriale, bei den anderen 3 die epitheliale Fläche mit der Außenseite in Berührung stand. Erstere wurden ein für alle Mal als a-Versuche, letztere als b-Versuche bezeichnet.

Die Diffusionszeit wurde nicht bestimmt festgelegt, sondern je nach dem Grade der Stärke und Schnelligkeit der Diffusion variiert.

Die eingangs erwähnte Tatsache, daß weder Sauerstoffmangel noch Kälte den Ablauf der Diffusion zu beeinflussen vermögen, veranlaßte uns, von vornherein alle Versuche in der Kälte und ohne Sauerstoffzufuhr auszuführen.

Die Diffusionsstärke wurde colorimetrisch durch Messung der Farbstoffmenge in der Außenflüssigkeit in bestimmter, noch zu schildernder Weise ermittelt.

Wir verwandten 5 verschiedene Farbstoffe:

1. Benzopurpurin,
2. Diamingrün,
3. Kongorot,
4. Trypanblau,
5. Seyderhelmsche Lösung (gleiche Mischung von Kongorot und Trypanblau)

und erzielten folgende Ergebnisse.

Erste Versuchsreihe.

(10 Versuche)

Farbstoff: Benzopurpurin in isotonischer Traubenzuckerlösung (1:1000), die deswegen angewandt wurde, weil der Farbstoff in Elektrolytlösungen wenig stabil ist und leicht ausflockt.

Außenflüssigkeit: Isotonische Traubenzuckerlösung.

Die Diffusionsstärke wurde an Hand einer 0,009 %igen Standardlösung des Farbstoffes derart bestimmt, daß ihr Colorimeterwert gleich 100 gesetzt und das Plus oder Minus an diffundiertem Farbstoff in der Außenflüssigkeit danach prozentual berechnet wurde.

Die Tabelle I zeigt, daß alle 10 Versuche im Sinne einer stärkeren Diffusion im b-Versuch ausgefallen sind.

Tabelle I.

Nr.	Diffusionszeit	Resultate in Prozenten: a-Versuche			b-Versuche		
		1	2	3	1	2	3
1	3 Stunden	104	100	—	128	123	—
2	10 Stunden	99	—	—	136	—	—
3	7½ Stunden	106	112	—	154	160	—
4	3½ Stunden	116	121	—	154	150	—
5	12 Stunden	150	127	—	160	159	—
6	4½ Stunden	106	99	—	130	138	—
7	10½ Stunden	116	110	118	152	159	145
8	4¼ Stunden	106	92	99	119	112	110
9	10 Stunden	106	104	99	130	140	125
10	6 Stunden	200	192	195	266	242	234

Zweite Versuchsreihe.

(6 Versuche)

Farbstoff: Diamingrün in Ringerlösung (1:500).

Außenflüssigkeit: Ringerlösung.

Die Bestimmung der Diffusionsstärke wurde in dieser, wie auch in den folgenden Versuchsreihen derart vorgenommen, daß der Colorimeterwert der im a-Versuch am intensivsten gefärbten Außenflüssigkeit gleich 100 gesetzt und danach jedesmal das Plus bzw. Minus an diffundiertem Farbstoff in der Außenflüssigkeit prozentual bestimmt wurde.

In 4 von 6 Versuchen (Tabelle II) ließ sich eine stärkere Diffusion in der Richtung zur b-Seite fesstellen.

Tabelle II.

Nr.	Diffusionszeit	Zahl der Versuche	Resultate der b-Versuche		
			1	2	3
			in Prozenten		
1	9 Stunden	3	111	107	111
2	3 Stunden	3	135	115	100
3	4 Stunden	3	107	104	111
4	$2^3/_4$ Stunden	3	100	96	81
5	$2^3/_4$ Stunden	3	100	90	96
6	$1^1/_2$ Stunden	3	115	130	135

Dritte Versuchsreihe.

(10 Versuche)

Farbstoff: Kongorot in Ringerlösung (1:1000).
Außenflüssigkeit: Ringerlösung.

Die Diffusion verlief, wie Tabelle III zeigt, in der überwiegenden Mehrzahl der Versuche beim Kongorot umgekehrt wie bei den übrigen Farbstoffen.

Über den Grund dieses Ausfalles der Versuche läßt sich nur soviel sagen, daß Fehler in der Methodik mit ziemlicher Sicherheit ausgeschlossen werden können.

Tabelle III.

Nr.	Diffusionszeit	Zahl der Versuche	Resultate der b-Versuche		
			1	2	3
			in Prozenten		
1	7 Stunden	3	90	107	91
2	1,5 Stunden	3	90	93	85
3	35 Minuten	3	91	83	92
4	$2^1/_4$ Stunden	3	115	100	115
5	4,5 Stunden	3	115	125	—
6	1,5 Stunden	3	90	92	88
7	1,5 Stunden	3	89	89	82
8	2,5 Stunden	3	104	115	107
9	3,5 Stunden	3	80	40	66
10	1 Stde. 10 Min.	3	90	85	76

Vierte Versuchsreihe.

(10 Versuche)

Farbstoff: Trypanblau in Ringerlösung (1:1000).
Außenflüssigkeit: Ringerlösung.

Aus Tabelle IV geht hervor, daß in 80% der Versuche die Diffusion im b-Versuch stärker war als im a-Versuch.

Tabelle IV.

Nr.	Diffusionszeit	Zahl der Versuche	Resultate der b-Versuche		
			1	2	3
			in Prozenten		
1	1 Stde. 50 Min.	3	130	120	135
2	1¾ Stunden	3	120	107	130
3	1½ Stunde	3	84	104	73
4	1 Stunde	3	115	111	121
5	55 Minuten	2	120	115	—
6	1 Stunde	3	120	120	111
7	50 Minuten	3	150	166	174
8	50 Minuten	3	125	150	146
9	1 Stunde	3	64	70	62
10	1 Stunde	3	120	130	126

Fünfte Versuchsreihe.

(4 Versuche)

Farbstoff: Seyderhelmsche Lösung verdünnt mit Ringerlösung (1:10).
Außenflüssigkeit: Ringerlösung.

Alle 4 Versuche zeigten dann eine größere Diffusion, wenn die choriale Seite mit der Farbstofflösung in Berührung stand (Tabelle V).

Tabelle V.

Nr.	Diffusionszeit	Zahl der Versuche	Resultate der b-Versuche		
			1	2	3
			in Prozenten		
1	3 Std. 10 Min.	3	107	115	100
2	4 Stunden	3	115	104	107
3	3 Stunden	3	111	115	100
4	4⅛ Stunden	3	115	135	130

Zusammenfassend können wir sagen, daß sich bei den untersuchten Farbstoffen durchschnittlich eine stärkere Diffusion von der chorialen zur Epithelseite fand als umgekehrt, wobei nur das Kongorot eine Ausnahme machte. Hiermit ist also die von Runge und Schmidt früher beschriebene gerichtete Permeabilität des Amnions für eine weitere Anzahl von Farbstoffen nachgewiesen. Wir haben nun weiter in gleichlaufenden Parallelversuchen geprüft, ob sich durch anatomische Untersuchungen an den verwendeten Membranen vielleicht Unterschiede fänden, welche in Parallele mit den vorher beschriebenen Effekten zu setzen wären.

Wir sind dabei in folgender Weise vorgegangen: Unmittelbar nach dem Versuch wurden die Membranen in 4%iger Formalinlösung fixiert, und zwar in der Weise, daß sie auf Korkringe gespannt wurden. Hierauf wurden sie durch die Alkohol-Xylolreihe geführt und ein Stück direkt zur Untersuchung in Kanadabalsam eingebettet, während weitere Stücke nach Einbettung in Paraffin in 8 μ dicken Schnitten geschnitten und sowohl in ihrer ursprünglichen, aus dem Versuch stammenden Färbung als auch nach Gegenfärbung mit Haemalaun untersucht wurden. Es soll gleich vorweg betont werden, daß sich die Gegenfärbung mit Haemalaun als nutzlos erwies, da die Präparate hierdurch zu stark überfärbt wurden, so daß man den Originalfarbstoff nicht genügend erkennen konnte.

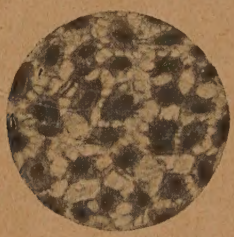

Abb. 3

Abb. 4

Abb. 5

Abb. 6

Das Ergebnis der Versuche war bei Betrachtung der Gesamtzahl für sämtliche Farbstoffe ein einheitliches. Es zeigte sich nämlich, daß eine deutliche Färbung des Zellinnern und der Kerne nur an den aus den a-Versuchen stammenden Membranen eintrat, d. h. in den Versuchen, bei denen die Farbstoffe in unmittelbarer Berührung mit der Oberfläche der Epithelien gestanden hatten. Bei den in den b-Versuchen verwendeten Amnien, also in den Fällen, in welchen das dem Chorion anliegende Bindegewebe mit dem Farbstoff in Berührung gestanden hatte, erschien zwar bei oberflächlicher Betrachtung die Färbung meistens intensiver, bei genauer Differenzierung erwies sie sich jedoch nur als eine Färbung der Bindegewebsfibrillen, während die Zellen frei blieben.

Die beigegebenen Abbildungen (Figuren 3—6) zeigen die Ergebnisse der Kongorot- und Trypanblau-Versuche, in denen die Färbung besonders klar zum Ausdruck kam, und zwar sowohl bei der Untersuchung der ganzen Membran als auch im histologischen Schnitt. Die Stufenleiter der deutlichen Erkennbarkeit des Effektes fiel vom Kongorot und Trypanblau über die Seyderhelmsche Lösung, Diamingrün zum Benzopurpurin ab. Bei diesem Farbstoff sind die Ergebnisse am wenigsten deutlich, so daß er allein uns wohl kaum davon hätte überzeugen können, daß in der Tat eine solche Verschiedenheit des Färbungseffektes eintritt, je nachdem in welcher Richtung man den Farbstoff diffundieren läßt.

Bei der Deutung dieser verschiedenen Differenzierungen ist natürlich in erster Linie daran zu denken, daß das Bindegewebe auf der chorialen Seite der Membran das Hineinkommen des Farbstoffes in die Zelle bei den b-Versuchen verhindert. Dieser Einwand ist jedoch nicht stichhaltig. Denn wir haben ja in allen Fällen so lange gewartet, bis eine reichliche Diffusion durch die Membran hindurch eingetreten war, und es zeigt sich ja sogar, daß mit Ausnahme der Kongorot-Versuche die Diffusion im b-Versuch eine stärkere war als im a-Versuch, d. h. also, daß die Färbung der Zellen, obwohl reichliche Farbstoff diffundiert, wenn man ihn entsprechend dem b-Versuch an die choriale Seite des Amnions bringt, doch eine geringere ist.

Recht schwierig ist nun die Beantwortung der Frage nach einer kritischen Bewertung dieser Versuche. Runge und Schmidt haben früher in gleicher Richtung angestellte Versuche dahin gedeutet, daß hierin vielleicht die Möglichkeit des Rückschlusses auf gewisse Sektretionsmechanismen gegeben wäre. Die Erfahrungen bei der Vitalfärbung lehren jedoch, wie außerordentlich

schwierig diese Rückschlüsse sind. Wir möchten daher an die vorliegenden Versuche und ihre Ergebnisse keinerlei theoretische Schlußfolgerungen knüpfen. Es schien uns aber doch der Mühe wert, nachzuweisen, daß hier färberisch ein Effekt erkennbar ist, der einen gewissen Parallelismus zu den gleichzeitig nachgewiesenen Permeabilitätsunterschieden zeigt.

Zum Schlusse erlaube ich mir, Herrn Professor Dr. Schröder für die freundliche Überlassung der Arbeit, sowie ganz besonders Herrn Professor Dr. Runge für seine stete Anregung und Unterstützung bei ihrer Ausführung meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Lebenslauf.

Ich, Friedrich Eduard Speckmann, wurde am 27. Oktober 1904 als Sohn des damaligen praktischen Arztes, jetzigen Medizinalrates Dr. Eduard Speckmann und seiner Ehefrau Grete, geb. Brandt in Schneverdingen (Prov. Hannover) geboren. Nachdem ich die Volksschulen in Schneverdingen und Otterndorf, sowie die höheren Schulen in Sensburg (Ostpr.), Braunschweig und Husum besucht hatte, bestand ich dortselbst Ostern 1925 die Reifeprüfung. Nach 5-semestrigem Studium in Tübingen und Kiel unterzog ich mich hier im August 1927 der medizinischen Vorprüfung. Meinen klinischen Studien oblag ich in Tübingen, München und Kiel, woselbst ich im Juni 1930 die medizinische Staatsprüfung ablegte.